

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-178752

(43)Date of publication of application : 11.07.1997

(51)Int.Cl.

G01N 33/569

G01N 33/48

// G01N 1/28

G01N 33/543

(21)Application number : 07-354687

(71)Applicant : LION CORP

(22)Date of filing : 26.12.1995

(72)Inventor : OISHI HIDEYUKI

(54) METHOD FOR DETECTING MICROORGANISM AND INSPECTION SET FOR DETECTION

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To enhance the detection sensitivity of microorganism in a specimen by pretreating the specimen with an enzyme destructing the membrane structure of microorganism.

SOLUTION: An enzyme destructing the membrane structure of a cell acts on various membrane structures of a microorganism to decompose the membrane structure of an object to be measured, i.e., an epitope. The enzyme activity includes an enzyme cutting the sugar chain known as glycosidase or phosphoglycosidase, an enzyme unbonding sugar-amino acid known as amidase, a peptide unbonding enzyme, e.g. end peptidase, exopeptidase or protease, and lipid decomposing enzyme, e.g. lipase or phospholipase. When the enzyme activities are combined appropriately, higher bacterolysis activity can be attained as compared with the case of single enzyme activity. According to the method, detection sensitivity of microorganism to be measured can be enhanced and correct diagnosis rate is enhanced in the diagnosis employing immunoreaction.

LEGAL STATUS

14

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報

(A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-178752

(43)公開日 平成9年(1997)7月11日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N	33/569		G 0 1 N	33/569 Z
	33/48			33/48 A
// G 0 1 N	1/28			33/543 6 0 1 H
	33/543	5 0 1		1/28 J

審査請求 未請求 求求項の数3 書面 (全 13 頁)

(21)出願番号 特願平7-354687

(22)出願日 平成7年(1995)12月26日

(71)出願人 000006769

ライオン株式会社

東京都墨田区本所1丁目3番7号

(72)発明者 大石 秀之

東京都墨田区本所1丁目3番7号 ライオ
ン株式会社内

(54)【発明の名称】 微生物の検出方法及び検出用検査セット

(57)【要約】

【構成】 細胞の膜構造を破壊する酵素で検体を前処理することを特徴とする免疫反応を利用した微生物の検出方法

【効果】 本発明によれば、測定対象の微生物の検出感度を著しく高めることが可能となり、免疫反応を利用した診断において、診断の正確さを大きく向上させることができる。本発明の方法は検体の前処理により検出感度を向上させるため、酵素抗体法、ラテックス凝集法、金コロイド法、ラジオイムノアッセイ法等の各種免疫学的検出方法において、その測定原理にかかわらず広く応用可能な感度改善手段となりうる。さらに、本発明の検査セットによれば、上記本発明の検出方法にしたがって検体中の微生物の検査を確実かつ簡便に実施することができ、本発明の検出用検査セットを自動分析装置に用いること、人手を介さずに大量の検体を迅速に処理することができる。

(2)

特開平9-178752

【特許請求の範囲】

【請求項1】免疫反応を利用した微生物の検出において、細胞の膜構造を破壊する酵素で検体を前処理することを特徴とする微生物の検出方法

【請求項2】細胞の膜構造を破壊するにあたり、酵素に界面活性剤を併用して検体を前処理することを特徴とする請求項1記載の微生物の検出方法

【請求項3】請求項1又は2記載の検体の前処理剤、免疫反応を行うための試薬及び器具とを具備してなる、免疫反応を利用した微生物を検出するための検出用検査セット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、検体中の微生物の存否、多寡を高感度に検出するための方法および検出用検査セットに関する。

【0002】

【従来の技術】免疫反応を利用し、病原体、細胞表面マーカー、血液型、ホルモン、薬物等の測定項目を、高感度かつ迅速に試験する方法が広く臨床検査法として応用され、感染症の診断と治療、臓器移植や輸血適合性、妊娠検査等、広く医学全般に大きな貢献をしている。特に感染症の場合、以前は病原体の特定は分離培養法を用いていたため、検査結果が得られるまでに長い時間を要していたが、免疫学的診断法の開発により、短時間に診断を下すことが可能となり、患者の享受する利益の大きさには計り知れないものがある。

【0003】免疫反応を利用し、検体中の抗原あるいは抗体を検出するためのマーカーとしては、以前から赤血球、菌体、ラテックス等が凝集反応を指標とする測定方法のに用いられていたが、検出感度が低いという欠点があった。この欠点を解決するため、放射性元素や酵素を標識とするラジオイムノアッセイ法 (Radioimmunoassay; RIA) や酵素抗体法 (Enzyme immunoassay; EIA) が開発され、高感度な検出方法として臨床検査の分野で広く利用されている。

【0004】感染症の診断においては検出感度の改善により正診率が高くなるため、少しでも感度を向上させるための技術開発が行われている。特に酵素抗体法においては、ラジオアイソトープを使用することなく高感度の測定が可能であることから、本法を対象とした技術開発が盛んである。中でも本法における感度の改善は新しい基質の開発が大きく寄与し、発色から蛍光、さらには発光物質が開発されるに及んで、ラジオイムノアッセイ法以上の検出感度を得るに至っている。この分野の技術情報については、臨床検査、38巻、第2号 (1994) 等に総説が掲載されている。しかし、蛍光あるいは発光の検出には蛍光分光計やフォトン検出器のような特別の機器を必要とするので、その利用が制限されるという

問題がある。現在、当分野では、特別の機器を必要としない検出感度の改善法の開発が待望されている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は上記事情に鑑みなされたものであり、現在行われている免疫反応を利用した微生物の検出方法において、簡便な手段により、検体中の微生物の検出感度を上げることが可能となる検出方法を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記課題を解決するため検討を重ねた結果、微生物の膜構造を破壊する酵素、あるいは該酵素及び界面活性剤で検体を処理することにより、検体中の微生物の検出感度を大幅に上げ、正確な診断をより早く下すことが可能であることを見い出し、本発明をなすに至ったものである。

【0007】以下、本発明につき更に詳しく説明する。本発明において微生物とは、細菌、リケッチャ族 (*Rickettsiae*)、クラミジア属 (*Chlamydia*)、ウイルス (*virus*)、および真核生物の原生生物を指す。

【0008】免疫反応とは、抗原と抗体の間に生ずる分子間の結合反応であり、高い特異性を持っている。免疫反応を利用して微生物の存否、多寡を判定する測定方法としては、具体的にはラテックス凝集反応、EIA、RIA、蛍光免疫測定法等、免疫学的研究分野で通常利用される各種測定法が含まれる。この中でも、ラテックス凝集反応と EIA は、特別な装置を必要とせず、簡便に実施できる臨床検査法として検出用キットが多数市販されている。

【0009】本発明によると、検体中の抗原である微生物を、該細胞の膜構造を破壊する酵素単独、あるいは界面活性剤との併用下で処理することにより、微生物表面に存在する抗原が可溶化され、その結果、1) 免疫反応が進行しやすくなる、2) エピトープの露出等の理由により検出感度が向上する。したがって、本発明は免疫反応を利用するどの測定方法においても、検出感度の向上が期待できる。さらに、抗原の可溶化により、不溶性抗原では適用が困難なイムノクロマトグラフィー法、オクテロニー法等も利用できるようになるという利点もある。

【0010】本発明において細胞の膜構造とは、質膜構造、細胞壁、細胞膜、エンベロープ等、微生物と外界との境界構造を指す。細胞の膜構造を破壊する酵素とは、前述した微生物の各種膜構造に作用し、測定対象となるエピトープの構造を破壊することなく、膜構造を分解する作用を有する酵素あるいは複合酵素を指す。酵素活性としては、グリコシダーゼやホスホグリコシダーゼとして知られる糖鎖を切断する酵素、アミダーゼとして知られる糖-アミノ酸間結合を切断する酵素、エンドペプチダーゼ、エキソペプチダーゼ、プロテアーゼ等のペプチ

(3)

特開平9-178752

ド結合切断酵素、リバーゼ、ホスホリバーゼ等の脂質分解酵素等が含まれる。さらに、上記の各酵素活性を適切な組み合わせを選択して併用することにより、単独の場合よりも高い溶菌活性が期待できることが知られている。複合酵素は安定な状態で複数の酵素活性を発揮できるので特に有利である。例えば、ストレプトマイセスグロビスピロルス (*Streptomyces globisporus*) ATCC # 21553 から得られるムタノリジンは、N-アセチルムラミダーゼ活性の他にプロテアーゼ活性も有しており、N-アセチルムラミダーゼ単独よりも高い溶菌活性を示す。その他にもカルボヒドラーーゼ、リバーゼ、プロテアーゼからなる複合酵素系なども知られている。なお、細胞壁を分解する酵素に関しては、山崎真狩、「生化学データブック I I」、858頁～866頁、社団法人 日本生化学会編集、東京化学会同人発行(1980年)や「溶菌酵素」、船津勝、鶴大典編集、講談社発行(1977年)等に詳細が記載されている。

【0011】本発明において界面活性剤とは、表面張力を減ずる作用を有し、可溶化、分散、浸透、乳化等の作用により、酵素による細胞の膜構造の破壊を促進する物質を指す。本発明者は、適切な界面活性剤処理を併用することにより、酵素単独使用の場合よりも検出感度が向上することを明らかにした。ここで使用する界面活性剤はその構造から、陰イオン性界面活性剤、陽イオン性界面活性剤、両性界面活性剤、非イオン性界面活性剤に分類される。陰イオン性界面活性剤としては脂肪酸誘導体、硫酸エステル型、スルホン酸型、リン酸エステル型等が知られている。陽イオン性界面活性剤としては4級アンモニウム塩、アミド結合アンモニウム塩、エステル結合アミンやエーテル結合を有する4級アンモニウム塩、複素環アミン、アミン誘導体等が知られている。両性界面活性剤としてはアミノ酸誘導体、イミダゾリン有機酸誘導体、アミノスルホン酸誘導体が知られている。非イオン性界面活性剤としてはポリオキシエチレン系、多価アルコール系、アルキロールアミド系、糖誘導体等が知られており、広く利用できる。

【0012】この中で、非イオン性界面活性剤は酵素による細胞の膜構造の破壊を妨害しにくく、利用しやすい。さらに、検体の処理後に行う免疫反応に対しても、陰イオン性界面活性剤、陽イオン性界面活性剤、両性界面活性剤が共存すると免疫反応を妨害する例が多く、界面活性剤による処理の後に、透析あるいはゲルろ過等の適当な方法で界面活性剤を除去する必要があった。例えば、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) は膜構造の破壊作用は強力であるが、免疫反応の阻害作用も大きく、SDS存在下での検出は不可能であった。これに対し、非イオン性界面活性剤は免疫反応の妨害の程度が小さく、良好な成績が得られる例が多かった。

【0013】界面活性剤処理を併用する場合は、酵素処

理と界面活性剤による処理の順序について、1) 界面活性剤で処理してから酵素処理を行う、2) 酵素処理をしてから界面活性剤で処理する、3) 酵素処理と界面活性剤処理を同時に使う、の三通りの組み合わせが可能である。なかでも同時に処理は測定時間の短縮に寄与するので好ましく、酵素活性を妨害しない界面活性剤の種類及びその濃度等の使用条件を設定してから実施することが望ましい。

【0014】免疫反応の実施条件は、各種免疫学的測定方法について、一般に当分野で通常行われている実験条件を採用することができる。

【0015】次に、本発明の検出用検査セットは、検体採取用器具、検体保存用器具、検体保存用溶液、細胞の膜構造の破壊処理を行うための反応容器、ビペットやピーカー等の計量用器具、細胞の膜構造を破壊する酵素、又は、細胞の膜構造を破壊する酵素および界面活性剤と、該試薬類を溶解又は懸濁するための緩衝液、及び免疫反応を行うための試薬及び器具からなる。ここで、免疫反応を行うための試薬及び器具は、測定原理によってそのセットの内容が異なる。例えば、ラテックス凝集法により測定する場合は、抗体で感作したラテックスの懸濁液、背景が黒色の判定用ボード、混合用のヘラが必要である。酵素抗体法の場合は、余剰の試薬を除去するための洗浄液、ブロッキング剤、酵素の基質とその溶解液、反応停止薬とその溶解液、発色用の色見本等が必要となる。

【0016】このような検出用検査セットによれば、操作に熟練しない場合でも安定した試験成績を修めることが可能となる。なお、セット化にあたっては、凍結乾燥等のドライ化で試薬の長期保存が可能となるが、ドライ化が困難の場合には、試薬の性状に合わせて、保存剤、防腐剤等を適宜使用することにより保存期間を長くすることができる。

【0017】本発明の検出用検査セットは、特に臨床検査分野において、感染症の早期診断に広く応用できるものであり、研究用試薬や理科教材等としても広く利用可能である。また、本発明の検出用検査セットを公知の免疫学的測定用の自動分析装置に応用することで、大量の検体を迅速に、人手を介さずに検出することもできる。

【0018】

【発明の効果】本発明によれば、測定対象の微生物の検出感度を著しく高めることが可能となり、免疫反応を利用した診断において正診率が高くなり、診断の正確さを著しく向上させることができる。本発明の方法は検体の前処理により検出感度を向上するため、酵素抗体法、ラテックス凝集法、金コロイド法、ラジオイムノアッセイ法等の各種免疫学的検出方法において、その測定原理にかかわらず広く応用可能な感度改善の手段となり得る。更に、本発明の検出用検査セットによれば、上記本発明の検出方法にしたがって検体中の微生物の検査を確実か

(4)

特開平9-178752

つ簡便に実施することができ、本発明の検出用検査セットを自動分析装置に用いると、人手を介さずに大量の検体を迅速に処理することができる。

【0019】

【実施例】以下、実施例と比較例を示し本発明を具体的に説明するが、特に記述のない操作は室温で行った。蛋白質の濃度は280nmにおける吸光度から算出した。なお、本発明は下記の実施例に制限されるものではない。

【0020】【実施例1】

1. 特異抗体の調製

1) 特開昭60-73463号に記載したバクテロイデス・ジンジバリス (Bacteroides gingivalis) 381株-現在の分類にしたがうと、ポルフィロモナス・ジンジバリス (Porphyromonas gingivalis、以下、P. gingivalisと記す) 381株-に対するモノクローン抗体No. 1を産生するハイブリドーマ株を使用した。

2) 同ハイブリドーマ株をマウス腹腔内に投与して得た腹水の50%確定洗液分から、プロテインGカラムを常法に従って操作し、免疫グロブリンG画分を得た。10mMリン酸緩衝化生理食塩水 (pH 7.4、以下、PBSと記す) に対して4°Cで一晩透析し、セントリカット U-50 (倉敷精機株式会社) で濃縮し、同緩衝液を用いて抗体溶液 (抗体として10mg/ml) を調製した。

【0021】2. ラテックスの感作

1) ラテックス粒子懸濁液 (日本合成ゴム株式会社、I mmutech G2801) 10μl および2μg/μlとなるように100mMグリシン緩衝化生理食塩水 (pH 8.2、以下、GBSと記す) に溶解した特異抗体溶液10μlとGBSをチューブに加え、全容量500μlとした。ローテーターを用いて回転 (約500r/min) させながら、37°Cで2時間処理した。

2) 透心分離により未吸着の特異抗体を除き、感作ラテックスをPBSで3回洗浄した後、500μlの1w/v%ウシ血清アルブミン添加PBS (以下、ブロッキング溶液と記す) 中に再懸濁し、同様にして室温で30分間処理し、ブロッキングを行なった。

3) 透心分離によりラテックス粒子を回収し、ブロッキ

ング溶液で洗浄後、0.05w/v%アジ化ナトリウムと0.1w/v%ウシ血清アルブミンを添加したPBSを用いて、ラテックス濃度が0.5w/v%となるようラテックス懸濁液を調製し、使用時まで4°Cで保存した。なお、ラテックス濃度は550nmにおける吸光度 (A₅₅₀) から換算して求めた。

【0022】3. 検体の調製

1) P. gingivalis 381株を用い、トリプチケースソイの透析外液にヘミン5μg/ml、メナジオン0.5μg/mlを添加した培地で、37°Cで3日間嫌気培養した。透心分離により菌体を回収し、PBSで4回洗浄した後、A₅₅₀が1.0となるように20mMトリス塩酸緩衝化生理食塩水 (pH 8.0) 中に懸濁し、菌懸濁液を調製した。この懸濁液を同緩衝液で段階的に希釈した。血液平板で生菌数をチェックした結果、A₅₅₀ = 1.0の菌懸濁液は約1×10⁹ cfu/mlに相当した。

2) 同緩衝液を用いて、リゾチーム (生化学工業株式会社、100940)、エチレンジアミン四酢酸の最終濃度がそれぞれ40mg/ml、100mMとなるような酵素液を調製した。

3) 1)で調製した菌懸濁液4mlに対して酵素液を0.2mlを添加した。酵素液を添加しないものを比較例とし、緩衝液を同量添加した。

4) 37°Cの恒温水槽中に30分間静置した後、直ちに検出操作を実施した。

【0023】4. 検出

黒色厚紙上に、ラテックス懸濁液20μlと検体20μlをとって良く搅拌した後、時々振盪しながら放置し、10分後に凝集の有無を肉眼で判定した。判定基準は、1) 凝集塊が認められ、ラテックスの白濁が消失した場合を++ (強陽性)、2) 白濁しているが、凝集塊が認められる場合を+ (陽性)、3) 凝集塊が認められない場合を- (陰性)とした。結果を表1に示した。表1の結果から、本発明の処理法を用いた結果検出感度が高くなり、より低濃度での菌の検出が可能となることを確認した。

【0024】

【表1】

(5)

特開平9-178752

菌数 (cfu/ml)	菌体処理	
	リゾチーム処理 (実施例1)	処理なし (比較例1)
1×10^5	++	+
5×10^5	++	+
1×10^6	+	-
5×10^6	+	-
1×10^7	-	-

【0025】[実施例2]

1. 特異抗体の調製

実施例1で調製したものを使用した。

2. ラテックスの感作

実施例1で調製したものを使用した。

3. 検体の調製

1) 実施例1で調製したP. gingivalis 38

1株の懸濁液を使用し、実施例1と同様にしてエチレン

ジアミン四酢酸存在下のリゾチーム処理を15分間実施した。酵素液を添加しないものを比較例とした。

2) さらにノニデット P-40 (Nonidet P-40 以下、NP-40と記す)を最終濃度0.01w/v%となるように添加した検体も試験した。

3) 超音波発生装置 (Nissei, US-150) を用いて(直徑3mmチップ)で10秒間全検体を超音波処理した後、直ちに検出操作を行った。

4. 検出

実施例1と同様に行なった。結果を表2に示した。

【0026】

【表2】

菌数 (cfu/ml)	菌体処理			
	NP-40 リゾチーム 実施例2	リゾチーム のみ 実施例3	NP-40 のみ 比較例2	無処理 比較例3
1×10^5	++	++	+	+
5×10^5	++	+	+	+
1×10^6	+	+	-	-
5×10^6	+	-	-	-
1×10^7	-	-	-	-

表2の結果から、本発明の処理法を用いた結果検出感度が高くなり、より低濃度での菌の検出が可能となることを確認した。

【0027】[実施例3]

1. 特異抗体の調製

1) エドワード ティー ザンダースらの方法 (Edward D. Zanders et al., Journal of Microbiology (1981), 122, 217-225) に準じ、ストレプトコッカス・ミュータンス (Streptococcus mutans、以下、S. mutans と記す) NCTC 10449株 (血清型c、以下、S. mutans 10449と記す) の培養液上清より、硫酸アンモニウム沈殿、DEAE-セルロースカラム、セファロース-6Bカラムの操作により蛋白質抗原cを得た。

2) 常法に従いアジュバントとともに蛋白質抗原cをウマとヒツジに投与し、抗体価の上昇を確認後に採血し、抗血清を分離した。この抗血清に対して33%飽和となるよう硫酸アンモニウムを添加し、4°Cで2回透析し、PBSに溶解した後、PBSに対して4°Cで一晩透析した。

3) 蛋白質抗原cとCNBr活性化セファロース4Bを用い、常法に従って蛋白質抗原c結合アフィニティカラムを調製した。硫酸アンモニウム沈殿画分を該アフィニティカラムを通して、結合画分を0.2Mグリシン-塩酸緩衝液 (pH 3.5) で溶出後、直ちに同容量の1Mトリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) を加えた。

4) その一部をPBSに対して4°Cで一晩透析、セントリカット U-50で濃縮を行ない、PBSでアフィニティー精製特異抗体溶液 (10mg/ml) を調製した。

【0028】2. 検體(菌懸濁液)の調製

1) S. mutans 10449とS. mutans OMZ175株 (血清型f) 以下、S. mutans OMZ175と記す) を、それぞれブレイン・ハート・インヒュージョン培地 (以下、BHI培地と記す) を用いて37°Cの嫌気性条件下で一晩培養した後、遠心分離により菌体を回収し、10mMリン酸緩衝化生理食塩水 (pH 6.5、以下、PBS (pH 6.5) と記す) で4回洗浄した後、 A_{550} が0.6となるように同緩衝液中に懸濁し、菌懸濁液を調製した。この懸濁液を段階的に希釈した。対照としてはPBS (pH 6.5) を用いた。なお、ミティス・サリバリウス寒天培地で生菌数をチェックした結果、 $A_{550} = 0.6$ の菌懸濁液は両菌株ともに約 2×10^9 cfu/mlに相当した。

2) PBS (pH 6.5) を用いて、1,000単位/mlのムタノリジン (Mutanolysin, Sigma Chemical Company, M 990

1)、100mM塩化マグネシウム、5w/v%ポリオキシエチレン (以下POEと略す) ソルビタンモノラウレート、5w/v%n-オクチル- β -D-グルコビラノシド、5w/v%POE (10) オクチルフェニルエーテル)、POE (20) セチルエーテルの各溶液を調製した。

3) 上記で調製した検体及び試薬を用いて、反応時に1mM塩化マグネシウムを含有し、同じく菌体濃度は 1×10^9 、 5×10^8 、 1×10^8 、 5×10^7 、 1×10^7 、 5×10^6 、 1×10^6 cfu/mlとなるような条件で溶菌処理を行った。なお、反応時のムタノリジン及び界面活性剤の濃度と処理条件は表3のように設定した。ムタノリジンを添加しないものを比較例とし、所定の処理時間が経過後、直ちに検出操作を行った。

【0029】3. 検出

1) EIA用96穴マルチウェルプレート (Costar, 3590) に抗蛋白質抗原cウマ抗体溶液 (10 μ g/ml PBS) を100 μ l添加し、飽和水蒸気下、4°Cで一晩静置した。

2) 抗体溶液を除いて常法通りに洗浄後、ウェルをプロッキング溶液で満たし、4時間静置した。

3) プロッキング溶液を除いて洗浄後、処理直後の検体を100 μ l添加し、30分間静置した。

4) 検体を除いて洗浄後、0.1w/v%ウシ血清アルブミン添加PBSを用いて調製した抗蛋白質抗原cヒツジ抗体溶液 (1 μ g/ml) を100 μ l添加し、30分間静置した。

5) 抗体溶液を除いて洗浄後、0.1w/v%ウシ血清アルブミン添加PBSを用いて2,000倍に希釈した「ペルオキシダーゼ標識化抗ヒツジIgG (H+L) ウサギ抗体」 (ザイメッド ラボラトリーズ Inc. : ZYMED Laboratories, Inc., 61-8620) を100 μ l添加し、30分間静置した。

6) 標識化抗体溶液を除いて洗浄後、ペルオキシダーゼ用発色キットA (株式会社タウンズ、ML-1110 A) の発色液100 μ lを添加して15分間静置し、続いて同停止液100 μ lを添加した。肉眼で発色の有無を観察し、発色ウェルを陽性とした。S. mutans OMZ175、S. mutans 10449の検出限界 (cfu/ml) をそれぞれ表3・表4、表5・表6に示した。表3乃至表6の結果から、本発明の処理法を用いた場合検出感度が高くなり、より低濃度での菌の検出が可能となることを確認した。

【0030】

【表3】

(7)

特開平9-178752

	実施例4	比較例4	実施例5	比較例5
ムタノリジン (単位/mmol)	5.0	-	2.5	-
P O E ソルビタン モノラウレート	0.1%	0.1%	-	-
ヒ-オクチル- β-ド-グルコ ビラノシド	-	-	0.05%	0.05%
P O E (10) オク チルフェニルエーテ ル	-	-	-	-
P O E (20) セチ ルエーテル	-	-	-	-
処理温度 (°C)	室温	室温	87	97
処理時間 (分)	20	20	20	20
検出限界	1×10^{-7}	1×10^{-4}	1×10^{-4}	1×10^{-4}

【0031】

【表4】

(8)

特開平9-178752

	実施例 6	比較例 6	実施例 7	比較例 7
ムタノリジン (単位/mℓ)	50	-	50	-
P O E ソルビタン モノラウレート	-	-	-	-
ヨ-オクチル- β-D-グルコ ピラノシド	-	-	0.02%	0.02%
P O E (10) オク チルフェニルエーテ ル	0.2%	0.2%	-	-
P O E (20) セチ ルエーテル	-	-	0.02%	0.02%
処理温度(℃)	室温	室温	87	97
処理時間(分)	20	20	20	20
投出脱界	1×10^7	1×10^7	6×10^6	1×10^8

界面活性剤の濃度はマ/m%で表示した。

【0032】

【表5】

(9)

特開平9-178752

	実施例8	比較例8	実施例9	比較例9
ムタノリジン (単位/mmol)	5.0	-	2.5	-
POEソルビタン モノラウレート	0.1%	0.1%	0.05%	0.05%
n-オクチル- B-D-グルコ- ピラノシド	-	-	0.05%	0.05%
POE(10)オク- チルフェニルエーテ- ル	-	-	-	-
POE(20)セチ- ルエーテル	-	-	-	-
処理温度(℃)	室温	室温	37	37
処理時間(分)	20	20	20	20
検出限界	5×10 ⁻⁴	1×10 ⁻⁴	6×10 ⁻⁴	1×10 ⁻⁴

【0033】

【表6】

(10)

特開平9-178752

	実施例10	比較例10	実施例11	比較例11
ムタノリジン (単位/m1)	50	-	50	-
POEソルビタン モノラウレート	-	-	-	-
ヌ-オクチル- B-D-グルコ ピラノシド	-	-	-	-
POE(10)オク チルフェニルエーテ ル	0.2%	0.2%	-	-
POE(20)セチ ルエーテル	-	-	0.1%	0.1%
処理温度(℃)	室温	室温	97	87
処理時間(分)	20	20	20	20
検出限界	5×10 ⁻⁴	1×10 ⁻⁴	5×10 ⁻⁴	1×10 ⁻⁴

界面活性剤の濃度はw/v%で表示した。

【0034】[実施例12]

1. 特異抗体の調製

1) エドワード ティー ザンダースらの方法 (Edward D. Zanders et al., Journal of Microbiology (1981), 122, 217-225) に準じ、ストレプトコッカス・ソブリヌス (*Streptococcus sobrinus*) 6715株 (血清型g、以下、*S. sobrinus* 6715と記す) の培養液上清より、硫酸アンモニウム沈殿、DEAE-セルロースカラム、セファロース-6Bカラムの操作により蛋白質抗原を得た。

2) 実施例3～7記載の方法と同様にして、蛋白質抗原gでウサギを免疫し、抗血清を分離した。続いで硫酸アンモニウムによる塩析、PBSに対する透析を同様に行った。

3) 蛋白質抗原gとCNBr活性化セファロース4Bを

用い、常法に従って蛋白質抗原g結合アフィニティカラムを調製した。硫酸アンモニウム沈殿画分を該アフィニティーカラムを通して、結合画分を0.2Mグリシン-塩酸緩衝液 (pH 3.5) で溶出後、直ちに同容量の1Mトリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) を加えた。

4) 10mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) に対して4°Cで一晩透析、セントリカット U-50で濃縮を行ない、同緩衝液でアフィニティー精製特異抗体溶液 (10mg/m1) を調製した。

【0035】2. 標識抗体の調製

1) 10mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) で調製した西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ (和光純薬工業株式会社、162-12883) 溶液 (5mg/m1) 2mlに100μlの100M過ヨウ素酸ナトリウム水溶液を添加し、30分間反応させた後、5mM酢酸緩衝液 (pH 4.5) に対して4°Cで一晩透析した。

2) 透析膜内液に1M炭酸緩衝液 (pH 9.5) を添加

してpHを9.5に調整した。

3) 1.で調製した特異抗体溶液2mlに1M炭酸緩衝液(pH9.5)100μlを加え、直ちに酵素溶液中に添加して2時間反応させた。

4) 1w/v%水素化ホウ素ナトリウム水溶液100μlを加えて氷水浴中で2時間反応させた後、PBSに対して4°Cで一晩透析した。

5) 10mMリン酸緩衝液(pH7.0)で平衡化したセファデックスG-200でゲルろ過して、酵素標識抗体画分を回収した。同画分をセントリカットU-50で濃縮した後、1mg/mlの特異抗体溶液と同等の抗原結合活性を有するように同緩衝液で濃度を調整した。

【0036】3. 検体の調製

1) *S. sobrinus* 6715をBHI培地を用いて37°Cの嫌気性条件下で一晩培養した後、遠心分離により菌体を回収した。10mMリン酸緩衝化生理食塩水(pH6.5、以下、PBS(pH6.5)と記す)で4回洗浄した後、 A_{550} が0.3となるように同緩衝液中に懸濁し、菌懸濁液を調製した。この懸濁液を実施例3~7と同様に段階的に希釈し、 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^4$ c.f.u./ml相当の菌懸濁液を調製した。対照としてはPBS(pH6.5)を用いた。なお、ミティス・サリバリウス寒天培地で生菌数をチェックした結果より、 $A_{550} = 0.3$ の菌懸濁液は約 1×10^9 c.f.u./mlに相当した。

2) 菌懸濁液10mlをポリプロピレン製チューブに取り、3,000×gで15分間遠心分離し、上清を除去した。

3) PBS(pH6.5)を用いて、N-アセチルムラミディス SG (N-Acetyl muramidase SG、生化学工業株式会社、100095)、塩化マグネシウム、界面活性剤の最終濃度が、それぞれ100単位/ml、1mM)、0.1w/v%となるよう

酵素液を調製した。この組成から酵素だけを除いた溶液で処理したもの比較例とした。界面活性剤としては、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、n-オクチル-β-D-グルコビラノシド、ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン(20)セチルエーテルを用いた。

4) 酵素液2mlを添加し、良く懸濁してから室温で30分間静置した。検体を二分し、その一部を0.45μmミリポアフィルターでろ過してろ過液を得た。反応液及びそのろ過液を用いて直ちに検出操作を行った。

【0037】4. 検出

1) 内径約8mmのガラスチューブに、抗蛋白質抗原ウサギ抗体溶液(10μg/ml PBS)を500μl添加し、4°Cで一晩静置した。

2) 抗体溶液を除いて常法通りに洗浄後、試験管を0.1w/v%ウシ血清アルブミン添加PBSで満たし、4°Cで一晩、ブロッキング処理した。

3) ブロッキング用溶液を除いて洗浄後、処理直後の検体を500μl添加し、30分間静置した。

4) 検体を除いて洗浄後、PBSで2000倍に希釈した酵素標識抗体溶液(2.で調製したもの)500μlを添加して30分間静置した。

5) 標識化抗体溶液を除いて洗浄後、ペルオキシダーゼ用発色キットA(株式会社タウンズ、ML-1110 A)の発色液500μlを添加して15分間静置し、統一停止液500μlを添加した。肉眼で発色の有無を観察し、発色チューブを陽性とした。検出限界(c.f.u./ml)を表5に示した。表5の結果から、本発明の処理法を用いた結果検出感度が高くなり、より低濃度での菌の検出が可能となることを確認した。

【0038】

【表7】

(12)

特開平9-178752

検体 界面活性剤	実験例 1.3		比較例 1.3	
	原液	問ろ過液	原液	問ろ過液
POE ソルビタン モノラウレート	1×10^8	1×10^6	1×10^7	ND [*]
ヌーオクチル- B-D-グルコ ピラノシド	1×10^4	5×10^3	1×10^7	ND
POE (10) オク チルフェニルデーテ ル	1×10^6	1×10^5	1×10^7	ND
POE (20) セチ ルエーテル	5×10^4	5×10^3	1×10^7	ND

データは cfu/ml で表示した。

ND : 1×10^8 cfu/ml が検出できなかったことを示す。

【0039】【実施例14】下記内容からなるストレプトコッカス・ミュータンスの検出キットを作成した。

1. パラフィン・ペレット

2. プラスチック・カップ

3. プラスチック・スポット

4. 酵素反応用チューブ

5. 免疫反応用チューブ

抗ストレプトコッカス・ミュータンス抗体をコーティングしたチューブ PBS を用いて、実施例3で調製した抗蛋白質抗原 c ユマ抗体溶液（抗体濃度： $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）

1）を調製し、ポリスチレン製チューブの表面に抗体を吸着させた後、ウシ血清アルブミンでブロッキング処理し、0.1w/v%ウシ血清アルブミン添加 PBS で満たしたもの。

6. 界面活性剤水溶液

20%ポリオキシエチレン ソルビタン モノラウレート水溶液

7. 酵素

ムタノリジン（500単位）の凍結乾燥品

8. 酵素溶解液

100 mMリン酸緩衝化生理食塩水（pH 6.5）

9. 抗体 I

実施例3で調製した抗蛋白質抗原 c ヒツジ抗体（10 μg ）とウシ血清アルブミン（1mg）の凍結乾燥品

10. 抗体 II

アルカリ性ホスファターゼ結合抗ヒツジ免疫グロブリン G 抗体（抗体として $5 \mu\text{g}$ ）とウシ血清アルブミン（1 mg）の凍結乾燥品

11. 抗体溶解液

50 mMリン酸緩衝化生理食塩水（pH 7.4）

12. 基質

p-ニトロフェニルリン酸ニナトリウム六水和物 5 mg

13. 基質溶解液

1 mM塩化マグネシウムを含む 1 M ジエタノールアミン緩衝液（pH 9.8）

14. 隅性対照

所定の cfu に相当する *S. mutans* 懸濁液を、ムタノリジンで完全に溶菌させた得た溶菌液のミリポアフィルターろ過液

1×10^4 cfu/ml, 1×10^6 cfu/ml, 1×10^8 cfu/ml

15. 洗浄液

PBS で調製した 0.05w/v% ポリオキシエチレン ソルビタンモノラウレート溶液

16. 反応停止液

2N 水酸化ナトリウム

17. タイマー

(13)

特開平9-178752

【0040】18. 取扱説明書（唾液が検体の場合）

- 1) 測定に先立って、下記の試薬を調製する。
・凍結乾燥酵素に酵素溶解液 1m l を添加、溶解させ、酵素溶液とする。
・抗体 I 、抗体 II にそれぞれ抗体溶解液 1m l を添加、溶解させ、それぞれ抗体溶液 I 、 II とする。
・基質に基質溶解液 10m l を添加、溶解させ、基質溶液とする。
2) パラフィン・ペレットを 5 分間噛んだ後、唾液をプラスチック・カップに取る。
3) プラスチック・スポットで唾液を 0.5m l 取り、酵素反応用チューブの底の部分加え、界面活性剤水溶液 1 滴を加え、良く混ぜてから 1 分放置する。続いて、酵素溶液 2 滴を加え、良く混ぜてから 20 分間放置する。

- 4) プラスティック・スポットで酵素処理した唾液を取り、免疫反応用チューブの底の部分に 5 滴落とし、 15 分間放置する。
- 5) 洗浄液で免疫反応用チューブを 3 回洗浄する。
- 6) 抗体溶液 I を 5 滴加え 15 分間放置した後、 5) と同様に洗浄する。
- 7) 抗体溶液 II を 5 滴加え 15 分間放置した後、 5) と同様に洗浄する。
- 8) 基質溶液を 10 滴を加え良く混ぜてから加え、そのまま放置し、発色の程度を観察する。
- 9) 陽性対照に発色を認めたら反応停止液を 1 滴加える。
- 10) 陽性対照および検体の発色の程度を比較し、検体中の *S. mutans* 濃度を判定する。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.